

10/5/6360

PCT/JP03/06988

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

03.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 6月 3日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-162130

[ST.10/C]:

[JP2002-162130]

出 願 人

Applicant(s):

三菱ウェルファーマ株式会社

REC'D 18 JUL 2003

WIPO

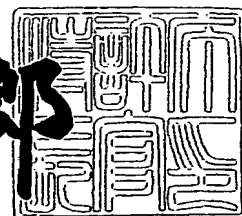
PCT

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 3日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3052651

【書類名】 特許願  
【整理番号】 YK02004  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K 31/416  
A61P 35/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号  
三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 鈴木 毅

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号  
三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 北野 靖典

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号  
三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 矢野 慎二

【特許出願人】

【識別番号】 000006725

【氏名又は名称】 三菱ウェルファーマ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100082511

【氏名又は名称】 高柳 昌生

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013114

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

特2002-162130

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0114651

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 Her2又は/及びEGFR発現患者に用いる予防又は/及び治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患を患っていると予想される患者において、Her2又は/及びEGFR発現を検出するための検査により患者のHer2又は/及びEGFR発現を診断し、その結果、Her2又は/及びEGFRが過剰発現していると判断された患者の治療のために投与することを特徴とするHer2又は/及びEGFR阻害剤。

【請求項 2】 Her2及びEGFRが共に過剰発現している患者に対して投与するHer2及びEGFR阻害剤である請求項 1 に記載の阻害剤。

【請求項 3】 Her2及びEGFR阻害剤が、Her2阻害剤及びEGFR阻害剤からなる合剤である請求項 2 に記載の阻害剤。

【請求項 4】 Her2阻害剤及びEGFR阻害剤を同時に、別々に、又は経時的に使用することを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の阻害剤。

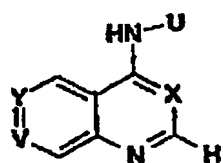
【請求項 5】 Her2又は/及びEGFR発現を検出するための検査が、抗体を用いた免疫学的方法又は核酸及び核酸誘導体を用いたハイブリダイゼーション法である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の阻害剤。

【請求項 6】 抗体を用いた免疫学的方法が、固相酵素免疫検定法、酵素-結合免疫アッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、免疫組織化学的方法、及びウエスタンブロット法からなる群より選ばれる方法である請求項 5 に記載の阻害剤。

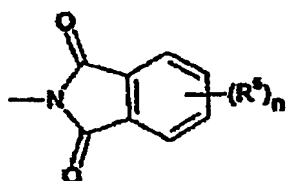
【請求項 7】 核酸及び核酸誘導体を用いたハイブリダイゼーション法が、RT-PCR法、ISH法、FISH法、ノーザンブロット法、及びサザンブロット法からなる群より選ばれる方法である請求項 5 に記載の阻害剤。

【請求項 8】 Her2又は/及びEGFR阻害剤が下記一般式 (I)

## 【化1】



(b)



(a)

{式中、XはN又はCHであり；Yが $CR^1$ であって、VがNであるか；又はYがNであって、Vが $CR^1$ であるか；又はYが $CR^1$ であって、Vが $CR^2$ であるか；又はYが $CR^2$ であって、Vが $CR^1$ であり； $R^1$ は $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、 $CH_3SO_2CH_2CH_2NHCH_2-Ar-$ （ここで、Arはフェニル、フラン、チオフェン、ピロール及びチアゾールから選択され、その各々は所望により1もしくは2個のハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル又は $C_{1-4}$ アルコキシで置換されていてもよい。）又は $-C\equiv C-C(R^6)(R^7)(R^8)$ （ここで、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシ、ハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル又は $C_{1-4}$ アルコキシ、又は、環が水素原子又は $C_{1-4}$ アルキルで置換されていてもよく、環内にO、S又はNから選ばれる1から2個のヘテロ原子を含んでいてもよい $C_{3-6}$ のシクロアルキルを表す。）を表し； $R^2$ は水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、 $C_{1-4}$ アルキルアミノ、ジ $[C_{1-4}$ アルキル]アミノ及び $-NHCO-R^9$ （ここで、 $R^9$ は $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、 $C_{2-4}$ アルケニル又は $C_{2-4}$ アルキニルを示す。）からなる群から選択され；Uは $R^3$ 基で置換され、かつさらに所望により独立に選択される少なくとも1個の $R^4$ 基で置換されていてもよいフェニル、ピリジル、3H-イミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、1H-インダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-インダゾリル、1H-ベンズイミダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-ベンズイミダゾリル又は1H-ベンゾトリアゾリル基を表し； $R^3$ はベンジル、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジル、ベンゾイル、ピリジルメチル、ピリジルメトキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジルオキシならびにベンゼンスルホニルからなる群から選択されるか；又は $R^3$ はトリハロメチルベンジル又はトリハロメチルベンジ

ルオキシを表すか；又は $R^3$ は上記式(a)の基を表し(式中、 $R^5$ は各々独立にハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル及び $C_{1-4}$ アルコキシから選択され；かつ、 $n$ は0～3である)； $R^4$ は各々独立にヒドロキシ、ハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{2-4}$ アルケニル、 $C_{2-4}$ アルキニル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、アミノ、 $C_{1-4}$ アルキルアミノ、ジ[ $C_{1-4}$ アルキル]アミノ、 $C_{1-4}$ アルキルチオ、 $C_{1-4}$ アルキルスルフィニル、 $C_{1-4}$ アルキルスルホニル、 $C_{1-4}$ アルキルカルボニル、カルボキシ、カルバモイル、 $C_{1-4}$ アルコキシカルボニル、 $C_{1-4}$ アルカノイルアミノ、 $N-(C_{1-4}$ アルキル)カルバモイル、 $N,N$ -ジ( $C_{1-4}$ アルキル)カルバモイル、シアノ、ニトロ及びトリフルオロメチルである。)で示される置換ヘテロ芳香族化合物、もしくはその薬学的に許容される塩、又はそれらの水和物もしくは溶媒和物である請求項1から7のいずれかに記載の阻害剤。

【請求項9】 Her2又は/及びEGFR阻害剤が、

(4-(3-フルオロベンジルオキシ)-フェニル)-(6-(5-(2-メタンスルホニル-エチルアミノ)メチル)-フラン-2-イル)-ピリド[3,4-d]ピリミジン-4-イル)-アミン；

(4-ベンジルオキシフェニル)-(6-(5-(2-メタンスルホニル-エチルアミノ)-メチル)-フラン-2-イル)-キナゾリン-4-イル)-アミン；

$N-\{4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル\}-6-[5-\{[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ\}メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミン；$

$N-[4-(ベンジルオキシ)フェニル]-7-メトキシ-6-[5-\{[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ\}メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミン；$

$N-(1-ベンジル-1H-インダゾール-5-イル)-7-メトキシ-6-[5-\{[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ\}メチル]-2-フリル]-4-キナゾリンアミン；$

$N-\{3-フルオロ-4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル\}-6-[5-\{[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ\}メチル]-2-フリル$

ル] - 4 - キナゾリンアミン;

N - [1 - (3 - フルオロベンジル) - 1H - インダゾール - 5 - イル] - 6 -  
[2 - ( { [2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ } メチル) - 1, 3 - チ  
アゾール - 4 - イル] - 4 - キナゾリンアミン;

6 - [5 - ( { [2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ } メチル) - 2 - フ  
リル] - N - [4 - (フェニルスルホニル) フェニル] - 4 - キナゾリンアミン  
;

N - { 3 - フルオロ - 4 - [ (3 - フルオロベンジル) オキシ] フェニル } - 6  
- [2 - ( { [2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ } メチル) - 1, 3 -  
チアゾール - 4 - イル] - 4 - キナゾリンアミン;

N - (1 - ベンジル - 1H - インダゾール - 5 - イル) - 6 - [2 - ( { [2 -  
(メチルスルホニル) エチル] アミノ } メチル) - 1, 3 - チアゾール - 4 - イ  
ル] - 4 - キナゾリンアミン;

N - (3 - フルオロ - 4 - ベンジルオキシフェニル - 6 - [5 - ( { [2 - (メ  
チルスルホニル) エチル] アミノ } メチル) - 4 - フリル] - 4 - キナゾリンア  
ミン;

N - (3 - クロロ - 4 - ベンジルオキシフェニル - 6 - [2 - ( { [2 - (メチ  
ルスルホニル) エチル] アミノ } メチル) - 4 - フリル] - 4 - キナゾリンアミ  
ン;

N - { 3 - クロロ - 4 - [ (3 - フルオロベンジル) オキシ] フェニル } - 6 -  
[5 - ( { [2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ } メチル) - 2 - フリル  
] - 4 - キナゾリンアミン;

N - (1 - ベンジル - 1H - インダゾール - 5 - イル) ) - 7 - フルオロ - 6 -  
[5 - ( { [2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ } メチル) - 2 - フリル  
] - 4 - キナゾリンアミン;

N - (3 - トリフルオロメチル - 4 - ベンジルオキシフェニル) - 6 - [5 - ( {  
[2 - (メチルスルホニル) エチル] アミノ } メチル) - 4 - フリル] - 4 -  
キナゾリンアミン;

N - [4 - (3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) アミノ] - 7 - [3 - (4 -

モルホリニル) プロポキシ] キナゾリン-6-イル] アクリルアミド; 又は  
N-{3-クロロ-4-[ (3-フルオロベンジル) オキシ] フェニル}-6-[  
5-({ [2-(メタンスルホニル) エチル] アミノ} メチル) -2-フリル] -  
4-キナゾリンアミンである化合物もしくはその薬学的に許容される塩、それら  
の水和物もしくは溶媒和物、それらの光学活性体もしくはラセミ体、又は、それ  
らのジアステレオマー混合物である請求項1から8のいずれかに記載の阻害剤。

【請求項10】 Her2又は/及びEGFR阻害剤が、N-[4-(3-クロロ-4-フル  
オロフェニル) アミノ]-7-[3-(4-モルホリニル) プロポキシ] キナ  
ゾリン-6-イル] アクリルアミド、又はN-{3-クロロ-4-[ (3-フル  
オロベンジル) オキシ] フェニル}-6-[5-({ [2-(メタンスルホニル)  
エチル] アミノ} メチル) -2-フリル] -4-キナゾリンアミンである化合物  
もしくはその薬学的に許容される塩、それらの水和物もしくは溶媒和物、それら  
の光学活性体もしくはラセミ体又はそれらのジアステレオマー混合物である請求  
項1から9のいずれかに記載の阻害剤。

【請求項11】 請求項1から10のいずれかに記載の阻害剤を有効成分とする医  
薬組成物。

【請求項12】 Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患の予防又は/及び  
治療薬である請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項13】 Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患が癌、癌及び肉腫  
の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生  
、動脈硬化、又は乾癬である請求項12に記載の医薬組成物。

【請求項14】 Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患を患っていると予  
想される患者において、Her2又は/及びEGFR発現を検出するための検査により患  
者のHer2又は/及びEGFR発現を診断し、その結果、Her2又は/及びEGFRが過剰発現  
していると判断された患者の治療のために投与することを特徴とするHer2又は/  
及びEGFRの過剰発現に起因する疾患の予防又は/及び治療薬。

【請求項15】 Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患が癌、癌及び肉腫  
の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生  
、動脈硬化、又は乾癬である請求項14に記載の予防又は/及び治療薬。



【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Her2又は/及びEGFRの発現診断を行い、それらの発現が確認された患者を治療の対象とする一連の治療方法に使用する薬剤に関する。

【0 0 0 1】

【従来の技術】

従来、抗癌剤の標的分子はDNAやRNAの合成に関与する分子そして細胞分裂に関与する分子が主であった。これらの抗癌剤は、標的分子が癌細胞特異的ではないため、骨髄毒性などの重篤な副作用を引き起こすことが知られている。

近年、分子腫瘍学の発展により癌の発生は癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常によって引き起こされることが明らかになった。最もよく知られた癌遺伝子として上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor、以下EGFRと略す。) とその類縁のhuman EGFR type2 (以下Her2と略す。別名erbB-2とも呼ぶ。) が挙げられる。

EGFRとHer2はそれぞれ分子量170kD、185kDの膜貫通型糖蛋白質である。EGFRとHer2の細胞内ドメインにはチロシンキナーゼドメインが存在し、リン酸化反応を通して増殖情報を核へ伝えている。互いのキナーゼドメインのアミノ酸配列は約80%の相同性を持ち構造的によく似ているが、C末端にある自己リン酸化ドメインの相同性は約30%と低く両レセプターの情報伝達機構に質的違いがあることが推察される。

EGFRは食道癌に89%と極めて高い頻度で発現している [J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1993 119, 401-407]。一方、その他の癌種では非小細胞肺癌の45%にEGFRの過剰発現 [Cancer Res. 1993 53, 2379-2385]、グリオブラストーマの50%にEGFRの遺伝子増幅 [Cancer Res. 2000 60, 1383-1387] などの報告がある。

Her2に関しては乳癌の39%に遺伝子増幅 [J. Clin. Oncol. 1993 11, 1936-1942]、卵巣癌の32%に過剰発現 [Cancer Res. 1990 50, 4087-4091]、ホルモン抵抗性前立腺癌の67%に過剰発現 [Clinical Cancer Res. 2001 7, 2643-2647] などの報告がある。

したがって、標的の発現が癌種によって異なる以上これらを標的とする治療は

当然ながら個別の治療を必要とする。すなわち、癌の性質を診断し標的分子の発現の有無に合わせて薬剤を選択すべきである。これにより効果的かつ合理的な治療が達成できる。

#### 【0002】

EGFRとHer2は互いにヘテロ複合体を形成し機能的な相互作用が見られる[J. Clin. Oncol. 2001 19(18s), 32s-40s]。そして、EGFRとHer2の共発現によりEGFR単独による癌化がさらに加速されることが知られている[Cell 1987 58, 287-292]。また、乳癌、口腔癌、肺癌等においてEGFRとHer2の共発現があると予後不良になるとの報告もある[Clin. Cancer Res. 1999 5, 4164-4174]。

したがって、EGFRとHer2両方を阻害する薬剤（以下、単にデュアル阻害剤とも称す。）はどちらか一方にしか作用しない薬剤に比べて適応疾患が広がる有利性があるのみならず、デュアル阻害の相乗作用によって共発現癌に対して効果的な治療を期待できる点でも優れている。

EGFRとHer2の発現量の診断技術は既に広く知られている。そしてEGFRに結合する抗体に蛍光色素をコンジュゲイトさせて口腔癌の前癌病変を早期に検出する試みも最近報告された[Cancer Res. 2001 61, 4490-4496]。一方、乳癌患者のHer2発現の有無によりアントラサイクリン系抗癌剤の抗腫瘍効果が予測できることを示唆する報告も出てきた[Clin. Cancer Res. 2001 7, 1577-1581]。したがって、EGFRやHer2の発現診断は病気を早期発見する役割と個々の患者に有効で適切な薬剤を選択するために有益となる可能性がある。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

EGFR阻害剤としては中和抗体とチロシンキナーゼ阻害剤が抗癌剤の臨床開発段階にある。Her2阻害剤では中和抗体ハーセプチン（Herceptin：商品名、Roche社）が転移性乳癌に対する治療剤として既に各国で上市されているが、チロシンキナーゼ阻害剤は抗癌剤の臨床開発段階である。

同様にEGFRとHer2のデュアル阻害剤も研究開発されているがまだ実用化には至っていない。

抗Her2抗体ハーセプチンはHer2の発現診断ハーセプテスト（Herceptest：商品

名) で治療対象患者の選別を既に行っているが、適応癌種は乳癌に限定されている。

EGFRキナーゼ阻害剤イレッサ (Iressa : 商品名、A.Zeneca社) には従来の抗癌剤が持つ骨髄毒性などの重篤な副作用がないこと、そして、非小細胞肺癌に有効であることが臨床試験で示されてきた [Clin. Cancer Res. 2001 7, 3780s]。しかし、イレッサの臨床試験では治療対象患者のEGFR発現を事前に確認する作業は行われていない。

EGFRとHer2のデュアル阻害剤は、いずれかの標的分子が発現している癌であれば適応範囲とする事ができるため、幅広い臓器癌を対象とする。しかし、既に記述したように、より正確には標的蛋白の発現診断により治療対象患者を適切に選別した上での処方が望ましく、デュアル阻害剤によるこの一連の治療法は医療現場において未だ確立されたものではない。

#### 【 0 0 0 4 】

癌組織中の標的分子の発現と抗癌剤の感受性に関する別の例としては、乳癌組織中のチミジル酸合成酵素 (Thymidylate synthase : TS) 発現量及びジヒドロピリミジン脱水素酵素 (Dihydropyrimidine dehydrogenase) 活性値と5FU感受性は関連があるとの報告がある [日本癌治療学会誌 2000 35, 340]。しかし、実際に治療法として5FU処方前にTS発現診断を行うには至っていない。

上記のように、抗癌剤の処方にあたり、薬剤の標的分子を診断して効果的な治療法を予測することが切望されている。

#### 【 0 0 0 5 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前述の事情を鑑み上記課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、

Her2又は／及びEGFRの発現診断を行い、それらの発現が確認された患者に対して投与することを特徴とするHer2又は／及びEGFR阻害剤により、一連の治療法を確立し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

#### 【 0 0 0 6 】

すなわち、本発明は、以下の通りである。

本発明は、

(1) Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患を患っていると予想される患者において、Her2又は/及びEGFR発現を検出するための検査により患者のHer2又は/及びEGFR発現を診断し、その結果、Her2又は/及びEGFRが過剰発現していると判断された患者の治療のために投与することを特徴とするHer2又は/及びEGFR阻害剤、

(2) Her2及びEGFRが共に過剰発現している患者に対して投与するHer2及びEGFR阻害剤である前記(1)に記載の阻害剤、

(3) Her2及びEGFR阻害剤が、Her2阻害剤及びEGFR阻害剤からなる合剤である前記(2)に記載の阻害剤、

(4) Her2阻害剤及びEGFR阻害剤を同時に、別々に、又は経時的に使用することを特徴とする前記(1)から(3)のいずれかに記載の阻害剤、

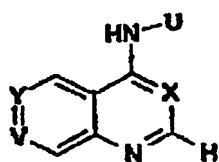
(5) Her2又は/及びEGFR発現を検出するための検査が、抗体を用いた免疫学的方法又は核酸及び核酸誘導体を用いたハイブリダイゼーション法である前記(1)から(4)のいずれかに記載の阻害剤、

(6) 抗体を用いた免疫学的方法が、固相酵素免疫検定法、酵素-結合免疫アッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、免疫組織化学的方法、及びウエスタンブロット法からなる群より選ばれる方法である前記(5)に記載の阻害剤、

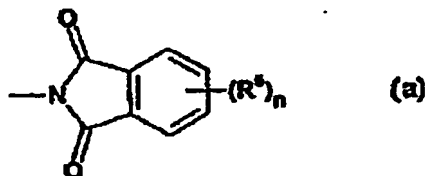
(7) 核酸及び核酸誘導体を用いたハイブリダイゼーション法が、RT-PCR法、ISH法、FISH法、ノーザンブロット法、及びサザンブロット法からなる群より選ばれる方法である前記(5)に記載の阻害剤、

(8) Her2又は/及びEGFR阻害剤が下記一般式(I)

【化2】



(I)



(a)

{式中、XはN又はCHであり；YがCR<sup>1</sup>であって、VがNであるか；又はYがNであって、VがCR<sup>1</sup>であるか；又はYがCR<sup>1</sup>であって、VがCR<sup>2</sup>である

か；又はYが $CR^2$ であって、Vが $CR^1$ であり； $R^1$ は $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、 $CH_3SO_2CH_2CH_2NHCH_2-Ar-$ （ここで、Arはフェニル、フラン、チオフェン、ピロール及びチアゾールから選択され、その各々は所望により1もしくは2個のハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル又は $C_{1-4}$ アルコキシで置換されていてもよい。）又は $-C\equiv C-C(R^6)(R^7)(R^8)$ （ここで、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシ、ハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル又は $C_{1-4}$ アルコキシ、又は、環が水素原子又は $C_{1-4}$ アルキルで置換されていてもよく、環内にO、S又はNから選ばれる1から2個のヘテロ原子を含んでいてもよい $C_{3-6}$ のシクロアルキルを表す。）を表し； $R^2$ は水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、 $C_{1-4}$ アルキルアミノ、ジ[ $C_{1-4}$ アルキル]アミノ及び $-NHCO-R^9$ （ここで、 $R^9$ は $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、 $C_{2-4}$ アルケニル又は $C_{2-4}$ アルキニルを示す。）からなる群から選択され；Uは $R^3$ 基で置換され、かつさらに所望により独立に選択される少なくとも1個の $R^4$ 基で置換されていてもよいフェニル、ピリジル、3H-イミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、1H-インダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-インダゾリル、1H-ベンズイミダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-ベンズイミダゾリル又は1H-ベンゾトリアゾリル基を表し； $R^3$ はベンジル、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジル、ベンゾイル、ピリジルメチル、ピリジルメトキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジルオキシならびにベンゼンスルホニルからなる群から選択されるか；又は $R^3$ はトリハロメチルベンジル又はトリハロメチルベンジルオキシを表すか；又は $R^3$ は上記式(a)の基を表し（式中、 $R^5$ は各々独立にハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル及び $C_{1-4}$ アルコキシから選択され；かつ、nは0～3である）； $R^4$ は各々独立にヒドロキシ、ハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{2-4}$ アルケニル、 $C_{2-4}$ アルキニル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、アミノ、 $C_{1-4}$ アルキルアミノ、ジ[ $C_{1-4}$ アルキル]アミノ、 $C_{1-4}$ アルキルチオ、 $C_{1-4}$ アルキルスルフィニル、 $C_{1-4}$ アルキルスルホニル、 $C_{1-4}$ アルキルカルボニル、カルボキシ、カルバモイル、 $C_{1-4}$ アルコキシカルボニル、 $C_{1-4}$ アルカノイルアミノ、N-( $C_{1-4}$ アルキル)カルバモイル、N、N-ジ( $C_{1-4}$ アルキル)カルバモイル、シアノ、

ニトロ及びトリフルオロメチルである。} で示される置換ヘテロ芳香族化合物、もしくはその薬学的に許容される塩、又はそれらの水和物もしくは溶媒和物である前記(1)から(7)のいずれかに記載の阻害剤、

(9) Her2又は/及びEGFR阻害剤が、

(4-(3-フルオロベンジルオキシ)-フェニル)-(6-(5-(2-メタンスルホニル-エチルアミノ)メチル)-フラン-2-イル)-ピリド[3,4-d]ピリミジン-4-イル)-アミン；

(4-ベンジルオキシフェニル)-(6-(5-(2-メタンスルホニル-エチルアミノ)-メチル)-フラン-2-イル)-キナゾリン-4-イル)-アミン；

N-{4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル}-6-[5-({[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ}メチル)-2-フリル]-4-キナゾリンアミン；

N-[4-(ベンジルオキシ)フェニル]-7-メトキシ-6-[5-({[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ}メチル)-2-フリル]-4-キナゾリンアミン；

N-(1-ベンジル-1H-インダゾール-5-イル)-7-メトキシ-6-[5-({[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ}メチル)-2-フリル]-4-キナゾリンアミン；

N-{3-フルオロ-4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル}-6-[5-({[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ}メチル)-2-フリル]-4-キナゾリンアミン；

N-[1-(3-フルオロベンジル)-1H-インダゾール-5-イル]-6-[2-({[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ}メチル)-1,3-チアゾール-4-イル]-4-キナゾリンアミン；

6-[5-({[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ}メチル)-2-フリル]-N-[4-(フェニルスルホニル)フェニル]-4-キナゾリンアミン；

N-{3-フルオロ-4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル}-6

－[2－（{ [2－（メチルスルホニル）エチル] アミノ} メチル）－1，3－チアゾール－4－イル]－4－キナゾリンアミン；

N－（1－ベンジル－1H－インダゾール－5－イル）－6－[2－（{ [2－（メチルスルホニル）エチル] アミノ} メチル）－1，3－チアゾール－4－イル]－4－キナゾリンアミン；

N－（3－フルオロ－4－ベンジルオキシフェニル－6－[5－（{ [2－（メチルスルホニル）エチル] アミノ} メチル）－4－フリル]－4－キナゾリンアミン；

N－（3－クロロ－4－ベンジルオキシフェニル－6－[2－（{ [2－（メチルスルホニル）エチル] アミノ} メチル）－4－フリル]－4－キナゾリンアミン；

N－{3－クロロ－4－[（3－フルオロベンジル）オキシ]フェニル}－6－[5－（{ [2－（メチルスルホニル）エチル] アミノ} メチル）－2－フリル]－4－キナゾリンアミン；

N－（1－ベンジル－1H－インダゾール－5－イル）－7－フルオロ－6－[5－（{ [2－（メチルスルホニル）エチル] アミノ} メチル）－2－フリル]－4－キナゾリンアミン；

N－（3－トリフルオロメチル－4－ベンジルオキシフェニル）－6－[5－（{ [2－（メチルスルホニル）エチル] アミノ} メチル）－4－フリル]－4－キナゾリンアミン；

N－[4－（3－クロロ－4－フルオロフェニル）アミノ]－7－[3－（4－モルホリニル）プロポキシ]キナゾリン－6－イル]アクリルアミド；又は

N－{3－クロロ－4－[（3－フルオロベンジル）オキシ]フェニル}－6－[5－（{ [2－（メチルスルホニル）エチル] アミノ} メチル）－2－フリル]－4－キナゾリンアミンである化合物もしくはその薬学的に許容される塩、それらの水和物もしくは溶媒和物、それらの光学活性体もしくはラセミ体、又は、それらのジアステレオマー混合物である前記（1）から（8）のいずれかに記載の阻害剤、

（10）Her2又は/及びEGFR阻害剤が、N－[4－（3－クロロ－4－フルオロ

フェニル) アミノ] -7- [3- (4-モルホリニル) プロポキシ] キナゾリン  
-6-イル] アクリルアミド、又はN-[3-クロロ-4- [(3-フルオロベ  
ンジル) オキシ] フェニル] -6- [5- ({ [2- (メタンスルホニル) エチル  
] アミノ} メチル) -2-フリル] -4-キナゾリンアミンである化合物もしくは  
はその薬学的に許容される塩、それらの水和物もしくは溶媒和物、それらの光学  
活性体もしくはラセミ体又はそれらのジアステレオマー混合物である前記(1)  
から(9)のいずれかに記載の阻害剤、

(11) 前記(1) から(10)のいずれかに記載の阻害剤を有効成分とする医  
薬組成物、

(12) Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患の予防又は/及び治療薬  
である前記(11)に記載の医薬組成物、

(13) Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患が癌、癌及び肉腫の成長  
に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈  
硬化、又は乾癬である前記(12)に記載の医薬組成物、

(14) Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患を患っていると予想され  
る患者において、Her2又は/及びEGFR発現を検出するための検査により患者のHer  
2又は/及びEGFR発現を診断し、その結果、Her2又は/及びEGFRが過剰発現してい  
ると判断された患者の治療のために投与することを特徴とするHer2又は/及びEGF  
Rの過剰発現に起因する疾患の予防又は/及び治療薬、並びに

(15) Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患が癌、癌及び肉腫の成長  
に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈  
硬化、又は乾癬である前記(14)に記載の予防又は/及び治療薬に関する。

【0007】

#### 【発明の実施の形態】

本発明における各定義は次の通りである。

「Her2又は/及びEGFR発現を検出するための検査」としては、Her2又は/及びEGFR  
に対する抗体を用いた免疫学的方法、又は、核酸及び核酸誘導体を用いたハイブ  
リダイゼーション法が挙げられ、免疫学的方法のより好ましい具体例としては、  
固相酵素免疫検定法、酵素-結合免疫アッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、免



疫組織化学的方法、又はウエスタンブロット法等が挙げられ、ハイブリダイゼーション法のより好ましい具体例としては、RT-PCR法、ISH法、FISH法、ノーザンブロット法、又はサザンブロット法等が挙げられる。

## 【0008】

「固相酵素免疫検定法 (ELISA=enzyme-linked immuno solvent assay)」とは、固相で行う酵素-結合免疫アッセイ法 (EIA) であり、抗原または抗体に共有結合で酵素を標識し、抗体または抗原の存在を、酵素活性を利用して検出する酵素-結合免疫アッセイ法を固相で行なう方法である。この方法は1971年 E.Engvallらによって開発されたラジオイムノアッセイ (放射性免疫測定法:RIA) の抗原、抗体のいずれかに標識する放射性同位体を非放射性的の酵素に置き換えたもので、1990年にzeptomole ( $10^{-21}$ モル) レベルの抗原の測定も可能な方法として開発された。

ELISA法には直接抗体法、間接抗体法、競合法、二抗体サンドイッチ法などがあり、測定目的にあった方法が選択される。固相にはアガロース、マイクロタイターウェル、ラテックス粒子などが利用され、標識酵素には、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼが最もよく利用される。その他の酵素としては、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ等も使われる。

なお、本発明においては、免疫組織化学的方法も適用可能である。

## 【0009】

「ウエスタンブロット法」とは、PVDF膜などのメンブランに転写された蛋白質を抗体をつかって検出する方法である。抗体と抗原の特異的結合を利用するためサンプルは微量で済み、特異的にターゲットとする蛋白質を検出できる。

## 【0010】

「ハイブリダイゼーション」とは、相補核酸鎖の相互作用を意味する。DNAは相補的相互作用 (CはG、AはTと常に結合) による二本鎖構造をとっているため、相補鎖を分離するとお互いに好んでリアニール、すなわち“ハイブリダイズ”する。これは2本のDNA鎖や、塩基配列が十分に相補的なDNA鎖とRNA鎖の間でも生じる。ハイブリダイゼーションは、複製や転写など全てのDNAの生理的反応において生じ、サザンブロッティングやノーザンブロッティング、PCR等多くの分子生物

学的手法の基礎をなす。

#### 【 0 0 1 1 】

「PCR (Polymerase Chain Reaction)」とは、DNA Polymeraseの反応を連続的、連鎖的に実行することにより、1セットのprimerの間にはさまれるDNA断片を特異的に増幅する反応である。中でも、逆転写反応とPCRを組み合わせた「RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)法」はもっとも感度が高い。

「ISH(in situ ハイブリダイゼーション)法」は組織断片での遺伝子発現の検出法として有効な手段である。本法と蛍光検出法とを組み合わせたものがFISH法である。

「ノーザンブロット法」とは、mRNAの解析を目的とした技術である。2次構造をとりやすいRNAを変成条件下で電気泳動し、メンブレン（ナイロンやニトロセルロース等）にトランスファーする。変成方法によって1.ホルムアミドとホルムアルデヒドを用いる方法、2.グリオキサールを用いる方法、又は3.水酸化メチル水銀を用いる方法等がある。

「サザンブロット法」とは、1975年にSouthernによって記載された転写の手法であり、標識された核酸プローブと相補的な塩基配列を持つ、転写されたDNAの領域を検出するものである。

#### 【 0 0 1 2 】

本発明においては、上記で挙げたような検査によりHer2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患を患っていると予想される患者を診断し、そのHer2又は/及びEGFRの発現を検出する。

#### 【 0 0 1 3 】

「Her2又は/及びEGFRの過剰発現に起因する疾患」の具体例としては、脳腫瘍、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、食道癌、胃癌、大腸癌、非小細胞肺癌、膵癌、胆管癌、胆嚢癌、肝癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、皮膚癌、小児固形癌、骨腫瘍、血管腫等の癌、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈硬化、乾癬等が挙げられ、脳腫瘍、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、食道癌、胃癌、大腸癌、非小細胞肺癌、膵癌、胆管癌、胆嚢癌、肝癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、皮膚癌等が好ましく、脳腫瘍、胃癌、大

腸癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、腎癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌等がより好ましい。

【 0 0 1 4 】

「Her2又は／及びEGFRの過剰発現」とは、生体の恒常性（ホメオスタシス）にとって必要な発現量以上の発現であり、同一起源の正常組織にとって必要な発現量以上の発現である。

「Her2又は／及びEGFRが過剰発現している患者」とは、Her2又はEGFRの少なくとも一方が過剰発現している患者、好ましくは両方が過剰発現している患者である。

本発明のHer2又は／及びEGFR阻害剤は、上記のようなHer2又は／及びEGFRが過剰発現している患者の治療のために投与することを特徴とする。

【 0 0 1 5 】

本発明の「Her2又は／及びEGFR阻害剤」としては、Her2及びEGFRが過剰発現している患者に対して投与するHer2及びEGFR阻害剤であることが好ましく、Her2阻害剤及びEGFR阻害剤からなる合剤であっても良く、Her2阻害剤及びEGFR阻害剤を同時に、別々に、又は、経時的に使用することも可能である。即ち、Her2阻害剤とEGFR阻害剤とを種々異なるルートにより同時に、別々に、あるいは、例えば同じ日に時間をずらして投与したり、数日から数週間又は数ヶ月にわたり、所定感覚で投与することも可能である。

本発明において使用するHer2阻害剤としては、抗Her2抗体ハーセプチン（Roche）、TAK-165（武田）、ETH-102（ExonHit Ther.）等が挙げられ、また、本発明において使用するEGFR阻害剤としては、イレッサ（A.Zeneca）、OSI-774（Roche）、PKI-166（Novartis）、EKB-569（Wyeth）等が挙げられる。これらの製造等に関しては、TAK-165についてはW O 02/06249号公報、特開2001-348385号公報、特開2002-69070号公報、特開平9-136877号公報、特開平11-60571号公報等に、イレッサについてはW O 96/33980号公報、特許第3040486号公報に、OSI-774についてはW O 96/30347号公報に、PKI-166についてはW O 97/02266号公報に、EKB-569については米国特許第6,002,008号に記載されている。

これらをHer2阻害剤及びEGFR阻害剤からなる合剤とする場合、それぞれの阻害剤から、1つ又は複数ずつを選択し適宜公知の方法により合剤を製造して使用する

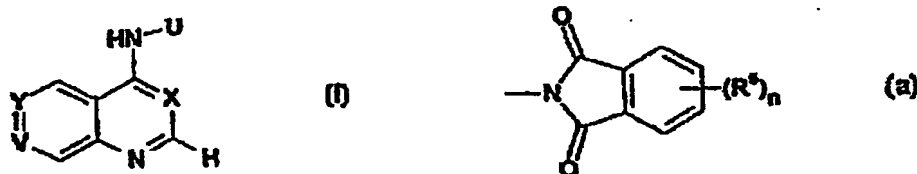
ことが出来る。

【0016】

本発明の阻害剤としては、Her2とEGFRとの両方を阻害する薬剤（以下、デュアル阻害剤と称することもある。）が好ましく、具体例としては、当該酵素の蛋白質キナーゼ活性の阻害に基づき作用する阻害剤、当該酵素の細胞内蛋白質含量を減少させることにより作用する阻害剤、又は当該酵素と情報伝達分子との物理的結合の阻害剤等が挙げられる。

「デュアル阻害剤」のより具体的な化合物の例としては、WO99/35146号公報（特表2002-500225号公報）に開示されている下記一般式（I）

【化3】



（式中、XはN又はCHであり；Yが $CR^1$ であって、VがNであるか；又はYがNであって、Vが $CR^1$ であるか；又はYが $CR^1$ であって、Vが $CR^2$ であるか；又はYが $CR^2$ であって、Vが $CR^1$ であり； $R^1$ は $CH_3SO_2CH_2CH_2NHCH_2-Ar$ 基（ここで、Arはフェニル、フラン、チオフェン、ピロール及びチアゾールから選択され、その各々は所望により1もしくは2個のハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル又は $C_{1-4}$ アルコキシ基で置換されていてもよい）を表し； $R^2$ は水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、 $C_{1-4}$ アルキルアミノ及びジ $[C_{1-4}$ アルキル]アミノからなる群から選択され；Uは $R^3$ 基で置換され、かつさらに所望により独立に選択される少なくとも1個の $R^4$ 基で置換されていてもよいフェニル、ピリジル、3H-イミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、1H-インダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-インダゾリル、1H-ベンズイミダゾリル、2,3-ジヒドロ-1H-ベンズイミダゾリル又は1H-ベンゾトリアゾリル基を表し； $R^3$

はベンジル、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジル、ベンゾイル、ピリジルメチル、ピリジルメトキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、ハロー、ジハロー及びトリハロベンジルオキシならびにベンゼンスルホニルからなる群から選択されるか；又は $R^3$ はトリハロメチルベンジル又はトリハロメチルベンジルオキシを表すか；又は $R^3$ は上記式(a)の基を表し(式中、 $R^5$ は各々独立にハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル及び $C_{1-4}$ アルコキシから選択され；かつ、 $n$ は0～3である)； $R^4$ は各々独立にヒドロキシ、ハロゲン、 $C_{1-4}$ アルキル、 $C_{2-4}$ アルケニル、 $C_{2-4}$ アルキニル、 $C_{1-4}$ アルコキシ、アミノ、 $C_{1-4}$ アルキルアミノ、ジ[ $C_{1-4}$ アルキル]アミノ、 $C_{1-4}$ アルキルチオ、 $C_{1-4}$ アルキルスルフィニル、 $C_{1-4}$ アルキルスルホニル、 $C_{1-4}$ アルキルカルボニル、カルボキシ、カルバモイル、 $C_{1-4}$ アルコキシカルボニル、 $C_{1-4}$ アルカノイルアミノ、 $N-(C_{1-4}$ アルキル)カルバモイル、 $N,N$ -ジ( $C_{1-4}$ アルキル)カルバモイル、シアノ、ニトロ及びトリフルオロメチルである。)で示される置換ヘテロ芳香族化合物、特に好ましくは、 $N-\{3\text{-クロロ}-4-[ (3\text{-フルオロベンジル})\text{オキシ}] \text{フェニル}\}-6-[5-(\{[2-(\text{メタンスルホニル})\text{エチル}]\text{アミノ}\}\text{メチル})-2\text{-フリル}]-4\text{-キナゾリンアミン}$ 等が、又はWO00/31048号公報に開示されている $N-[4-(3\text{-クロロ}-4\text{-フルオロフェニル})\text{アミノ}]-7-[3-(4\text{-モルホリニル})\text{プロポキシ}]\text{キナゾリン}-6\text{-イル}$ アクリルアミド等が挙げられる。

【0017】

一般式(I)の化合物の製造方法及びデュアル阻害作用についてはWO99/35146号公報に、 $N-[4-(3\text{-クロロ}-4\text{-フルオロフェニル})\text{アミノ}]-7-[3-(4\text{-モルホリニル})\text{プロポキシ}]\text{キナゾリン}-6\text{-イル}$ アクリルアミドの製造方法及びデュアル阻害作用についてはWO00/31048号公報に記載されている。

本発明に係るデュアル阻害薬には上記した全ての化合物の他に、デュアル阻害作用を有するその他の化合物が含まれる。

【0018】

本発明の阻害剤を医薬として用いる場合、本発明の阻害剤を製薬上許容しうる

担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物あるいは製剤（錠剤、ピル剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、エマルジョン剤、エリキシル剤、懸濁剤、溶液剤、注射剤、点滴剤あるいは坐剤等）の形態で経口的又は非経口的に投与することができる。

## 【 0 0 1 9 】

本発明において、非経口とは、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射あるいは点滴法等を含むものである。

経口投与用の固形投与剤型としては、粉剤、顆粒剤、錠剤、ピル剤、カプセル剤等の上記したものがあげられる。そのような剤型において、活性成分化合物は薬学上許容され得る少なくとも一つの添加物、例えばと混合することができる。

そのような剤型物は、また、薬学上許容され得るさらなる添加物（不活性希釈剤、滑沢剤、保存剤、抗酸化剤、崩壊剤、結合剤、増粘剤、緩衝剤、甘味付与剤、フレーバー付与剤、パーフューム剤等）を含むことができる。

## 【 0 0 2 0 】

経口投与用の液剤は、医薬として許容されるエマルジョン剤、シロップ剤、エリキシル剤、懸濁剤、溶液剤等が挙げられ、それらは当該分野で普通用いられる不活性希釈剤を含んでいてもよい。

## 【 0 0 2 1 】

注射用調剤（無菌注射用水性懸濁物あるいは油性懸濁物等）は、適当な分散化剤又は湿化剤及び懸濁化剤等を用いて当該分野で知られた方法で調製することができる。その無菌注射用調剤は、また、希釈剤あるいは溶剤を用いた無菌の注射のできる溶液または懸濁液であってもよい。さらに、通常溶剤又は懸濁化溶媒として無菌の不揮発性油も用いることができる。このためには、いかなる不揮発性油も脂肪酸も使用できる。

## 【 0 0 2 2 】

直腸投与用の坐剤は、その薬物と適当な非刺激性の補形剤、例えば常温では固体であるが、腸管の温度では液体で、直腸内で融解し、薬物を放出するもの等と混合して製造することができる。

## 【0023】

投与量は、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組合せ、治療を行っている患者のそのときの病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。例えば上記一般式 (I) で表される化合物を使用する場合、その1日の投与量は、患者の状態や体重、化合物の種類、投与経路等によって異なるが、経口的には  $0.01 \sim 1000 \text{ mg} / \text{kg}$  体重/日、好ましくは  $0.05 \sim 500 \text{ mg} / \text{kg}$  体重/日を、一日1～数回に分けて投与する。また、非経口的には、皮下、静脈内、筋肉内又は直腸内に、約  $0.01 \sim 50 \text{ mg} / \text{kg}$  体重/日、好ましくは  $0.01 \sim 20 \text{ mg} / \text{kg}$  体重/日投与するのが好ましい。

## 【0024】

## 【実施例】

以下、本発明について実施例を挙げて詳細に説明するが、その要旨を超えない限り、本発明は以下に限定されるものではない。

## 【0025】

## 実施例1

## EGFRチロシンキナーゼ阻害作用

## (方法)

試験に用いた薬剤PD 0183805は、EGFRチロシンキナーゼを阻害しEGFR過剰発現癌A431に対してin vivo制癌効果を示すことが知られている<sup>1)</sup>。また、PD 0183805の2塩酸塩CI-1033はMDA-MB-453細胞をハーレギュリン刺激した時のHer2、erbB3そしてerbB4のチロシンリン酸化を阻害することが報告されている<sup>2)</sup>。

以下の記載においてPD 0183805をPD、PD 0183805の2塩酸塩CI-1033をPD・2HClと略す。

また、PD及びPD・2HClの合成は、WO 00/31048号公報に記載された方法に準じて行なった。

1) Vincent, P.W., Patmore, S.J., Bridges, A.J., Kirkish, L.S., Dudeck, R.C., Leopold, W.R., Zhou, H., Elliott, W.L. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 40: 117, 1999.

2) Slichenmyer, W.J., Elliott, W.L. and Fry, D.W. Semin. Oncol., 28: 80, 2001.

【 0 0 2 6 】

ヒト類表皮癌細胞A431（東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより供与；カタログ番号TKG-0182、またはATCCより購入の場合；ATCC番号CRL-1555）より部分的に精製されたEGFRを用い、Linda J. Pikeらのチロシンキナーゼ活性測定方法（Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A., 1982, 79, 1433）を改良して行った。詳しい方法は以下の通りである。

A431細胞を10%FBS添加DMEM培地中で37℃、5%炭酸ガス下で培養し、この細胞を10 mM HEPES緩衝液(pH7.4)、0.25 M サッカロース、0.1 mM EDTAを含む溶液中でホモジネート後、3,000×Gで5分間遠心分離し、更にその上清を100,000×Gで30分間遠心分離を行いA431細胞膜画分を得、これを酵素源である部分精製EGFRとして測定に供した。

A431細胞膜画分（10～15 μg）、30 mM HEPES緩衝液（pH7.4）、2 mM MnCl<sub>2</sub>、100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、及びジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した薬剤の反応混液（終濃度 1% DMSO）に、100 ngのEGFを加えた後、合成基質アンジオテンシンII（Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe）50 μg、アデノシン三リン酸（γ-<sup>32</sup>P-標識体 37 KBqを含む）最終濃度10 μMを加えて反応を開始した。この時の容量は60 μLである。

反応は氷中にて30分間行い、10 mg/mL牛血清アルブミンを6 μLと20%トリクロロ酢酸25 μL加えて反応を停止し、そのまま氷中に30分間放置した。

その後5000 Gで2分間遠心した後、上清を40 μLサンプリングしてP81ホスホセルロースペーパーに吸着させた。これを0.75%リン酸水に5分間浸して洗浄する操作を4回繰り返した後ペーパーを取り出し、液体シンチレーションカウンターで<sup>32</sup>Pのカウントを測定し、この値をAとした。

同時に薬剤を添加しない反応、薬剤およびEGF共に添加しない反応のカウントも測定し、それぞれB、Cとした。

これらの値から、チロシンキナーゼ阻害率は、下記の式により求められる。



$$\text{阻害率(\%)} = 100 - \{ (A - C) / (B - C) \} \times 100$$

薬剤の添加濃度を変化させて得られた阻害率より  $IC_{50}$  値 (50%阻害濃度) を算出した。結果を下記表に示す。

【表 1】

EGFRチロシンキナーゼ阻害作用	
薬剤	$IC_{50}$ nM
PD	0.4

【 0 0 2 7 】

## 実施例 2

## 細胞 H e r 2 チロシンキナーゼ阻害作用

## (方法)

細胞は 6 5 9 番目のバリンをグルタミン酸に置換することにより恒常的に活性化した変異 c-erbB2 で形質転換した NIH3T3 マウス繊維芽細胞株 (東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより供与 ; カタログ番号 TKG-0298) を用いた (以下 A4 細胞と記す。 ) 。 この細胞株は 10% FBS 添加 DMEM/F12 混合培地 (以下アッセイ培地と記す。 ) により 37℃、 5 % 炭酸ガス下でプラスチック培養皿中で培養維持した。

アッセイ培地に懸濁した A4 細胞を 1 2 ウェルプレートに  $3 \times 10^5$  /well 蒔き込み、コンフレントになった細胞を薬剤とともに 2 時間 37℃ で培養した。細胞を PBS で 1 回洗浄した後、細胞溶解バッファ (60 mM トリス (pH6.8)、2% SDS、10% グリセロール、5% ベータメルカプトエタノール、0.001% プロモフェノールブルー) に再懸濁し、超音波処理したものを全細胞溶解液としてウェスタンブロット法に用いた。

蛋白量 25  $\mu$  g 分の全細胞溶解液を 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、PVDF 膜に転写した。膜をブロッキングした後、0.1% ツイーン 20 添加トリス緩衝液中で抗ホスホチロシン マウスモノクローナル抗体 PY20 (Transduction Laboratories、カタログ番号 P11120) とインキュベーションし、次に HRP 標識抗マウス 2 次抗体 (DAKO、カタログ番号 P0447) で処理した。膜を化学発光試薬 ECL w

estern blotting detection reagents(Amersham pharmacia biotech、カタログ番号RPN2209)で処理し化学発光をルミノCCDカメラで撮影した。化学発光の撮影と画像解析はMacintosh版デンストグラフ(ATT0、製品型式AE-6930)を用いて行った。

得られたリン酸化シグナルを定量化し、化合物非添加時のシグナルを100%コントロールとし、バックグラウンドシグナルを0%とし、薬剤によるリン酸化阻害を%コントロールで評価した。結果を下記表に示す。

【表2】

細胞H e r 2チロシンキナーゼ阻害作用		
薬剤	%コントロール (0.1 $\mu$ M)	%コントロール (1 $\mu$ M)
PD	77	12

## 【0028】

実施例1、2の結果より、PDはHer2又はEGFRのいずれに対しても阻害作用を示すこと、即ち、PDがHer2又は／及びEGFR阻害剤として作用することが理解できる。

## 【0029】

## 実施例3

## in vivo制癌効果

## (方法)

ヒト膀胱癌HPAC(ATCC番号CRL-2119)、ヒト直腸癌LS174T(ATCC番号CL-188)そしてヒト肺癌NCI-H520(ATCC番号HTB-182)はATCCより購入した。ヒト子宮頸癌ME180は東北大学加齢医学研究所・医用細胞資源センターより供与いただいた(カタログ番号TKG-0437、ATCCより購入の場合はATCC番号HTB-33)。Balb/c雌ヌードマウス(Balb/cAJcl-nuマウス、日本クレア社、入荷時5週令)の背部皮下にPBSに懸濁した培養ヒト癌細胞を $5 \times 10^6 / 100 \mu$ l移植し、7日前後経過して移植腫瘍の平均体積がほぼ $100 \text{ mm}^3$ となった時点で各群の平均腫瘍体積値が一定になるように1群4匹ずつ群分けを行った。

腫瘍体積値はノギスで長径と短径を測定し、 $[(\text{短径})^2 \times (\text{長径} / 2)] = \text{腫瘍体積} [\text{mm}^3]$ とした。群分けを行った日から14日間連日薬剤を1日1回強制経口

投与し、対照群のマウスには薬剤を与えなかった。投与開始日の腫瘍体積値を1とした相対腫瘍増殖率を対照群と薬剤処理群で算出した。制癌効果を%コントロールで示した。%コントロールは下記式により算出した。

$$\% \text{コントロール} = [ (\text{薬剤処理群の最終日の平均相対腫瘍増殖率} - 1) / (\text{対照群の最終日の平均相対腫瘍増殖率} - 1) ] \times 100$$

結果を下記表に示す。

【表3】

ヒト肺癌 HPAC (EGFR, Her2 両陽性) に対する制癌効果			
薬剤	投与量 mg/kg	平均相対腫瘍増殖率	%コントロール
対照	—	4.6	100
PD	10	2.4	39
PD	30	1.4	11

【0030】

【表4】

ヒト子宮頸癌 ME180 (EGFR 陽性, Her2 陰性) に対する制癌効果			
薬剤	投与量 mg/kg	平均相対腫瘍増殖率	%コントロール
対照	—	10.9	100
PD・2HCl	10	3.5	25
PD・2HCl	30	2.7	17

【0031】

【表5】

ヒト直腸癌 LS174T (EGFR 陰性, Her2 陽性) に対する制癌効果			
薬剤	投与量 mg/kg	平均相対腫瘍増殖率	%コントロール
対照	—	18.2	100
PD	10	10.7	56
PD	30	6.8	34

【0032】

【表6】

ヒト肺癌 NCI-H520 (EGFR、Her2 両陰性) に対する制癌効果			
薬剤	投与量 mg/kg	平均相対腫瘍増殖率	%コントロール
対照	—	8.7	100
PD・2HCl	10	8.3	95
PD・2HCl	30	7.7	87

【0033】

上記各表に示した結果から、Her2又は／及びEGFR阻害剤は、(EGFR、Her2両陽性)、(EGFR陽性、Her2陰性)又は(EGFR陰性、Her2陽性)の癌細胞に対して増殖抑制効果を示すこと、即ち、Her2又は／及びEGFR阻害剤はHer2又は／及びEGFRの過剰発現による疾患の予防・治療に有効であることが理解できる。

【0034】

## 実施例 4

ウェスタンブロット法によるEGFR又はHer2の発現確認

(方法)

ヒト膀胱癌HPAC (ATCC番号CRL-2119)、PANC1 (ATCC番号CRL-1469)、ヒトリンフォームDaudi (ATCC番号CCL-213)、ヒト大腸癌LS174T (ATCC番号CL-188) はATCCより購入した。ヒト外陰癌A431 (カタログ番号TKG-0182)、ヒト子宮頸癌ME180 (カタログ番号TKG-0437)、ヒト舌癌HSC-3 (カタログ番号TKG-0484)、HSC-4 (カタログ番号TKG-0489) は東北大学加齢医学研究所・医用細胞資源センターより供与いただいた。

100mm培養皿でほぼコンフルントになるまで細胞培養した。100mm培養皿の培地を除去しPBSで1回洗浄した後に約0.6mLのRIPAバッファ (50mM トリス(pH7.4)、150mM 塩化ナトリウム、1% NP-40、0.25% デオキシコール酸、1mM EDTA、プロテアーゼインヒビターカクテル) を添加し、氷上で10分間静置した。細胞溶解液を1.5mL遠心チューブに回収して10,000rpmで10分間冷却遠心した。上清を別なチューブに移してこの細胞溶解液をウェスタンブロット法に用いた。

蛋白量25  $\mu$ g分の細胞溶解液を7.5% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけた後PVDF膜に転写した。膜をブロッキングした後、0.1% ツイーン20添加トリス緩衝液中でEGFRに対する特異抗体(Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号sc-03)またはHer2に対する特異抗体(Upstate biotechnology、カタログ番号06-562)とインキュベーションし、次にHRP標識抗ウサギ2次抗体(ICN Pharmaceuticals、カタログ番号55689)で処理した。膜を化学発光試薬ECL western blotting detection reagents(Amersham pharmacia biotech、カタログ番号RPN2209)で処理し化学発光をルミノCCDカメラで撮影した。

図1に画像を示した。また、下記表に図1中の各レーンの説明を示した。

【0035】

【表7】

レーン	細胞株	上段図	下段図
		EGFR 発現	Her2 発現
1	HPAC	陽性	陽性
2	PANC1	陽性	陽性
3	ME180	陽性	陰性
4	Daudi	陰性	陰性
5	A431	陽性	陽性
6	LS174T	陰性	陽性
7	HSC3	陽性	陽性
8	HSC4	陽性	陽性

【0036】

#### 実施例 5

RT-PCR法によるEGFR又はHer2の発現確認

(方法) Molecular Cloning, A Laboratory Manual Vol. 1, Second Editionに従い実験を行なった。以下に詳細に記述する。

癌細胞からS.N.A.P.<sup>TM</sup> total RNA isolation kit (invitrogen、カタログ番号45-0472)によりtotal RNAを抽出した。得られたtotal RNAのうち1  $\mu$ gを用い

逆転写反応を行なった。逆転写反応は1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche、カタログ番号1 483 188) を用いて行なった。

このときのプライマーとしてはランダムプライマー p(dN)6を用いた。得られたcDNAの1 $\mu$ Lを用いてPCRを行った。EGFR mRNAの検出時はプライマーはHuman Epidermal growth factor receptor and GAPDH genes Dual-PCR kit (Maxim Biotech、カタログ番号DP-10065-G) 添付のプライマーを用い、酵素はTaKaRa Ex Taq<sup>TM</sup> (宝酒造、カタログ番号RR001A) を用いた。反応条件は96 $^{\circ}$ C 1分 1サイクル、96 $^{\circ}$ C 1分 58 $^{\circ}$ C 1分 30秒 30サイクル、72 $^{\circ}$ C 10分 1サイクルで行なった。Her2 mRNAの検出時はプライマーはRT-PCR primer set HUMAN erb-B2 (CLP、カタログ番号5254.H) 添付のプライマーを用い、酵素はTaKaRa Ex Taq<sup>TM</sup> (宝酒造、カタログ番号RR001A) を用いた。反応条件は94 $^{\circ}$ C 5分60 $^{\circ}$ C 5分 1サイクル、72 $^{\circ}$ C 2分 94 $^{\circ}$ C 1分 60 $^{\circ}$ C 1分 40サイクル、72 $^{\circ}$ C 10分 1サイクルで行なった。得られたPCR産物についてアガロース電気泳動を行い、発現の有無の確認を行なった。

#### 【 0 0 3 7 】

上記実施例4、5の結果から、ウエスタンブロット法やRT-PCR法によりHer2又はEGFRの発現確認が可能であることがわかる。

このような検査法を用いて患者におけるHer2又は／及びEGFRの発現を検査し、Her2又は／及びEGFRが過剰発現していると判断された場合には、Her2又は／及びEGFRの過剰発現に起因する疾患を患っていると判定し、本発明の医薬品を投与する。

#### 【 0 0 3 8 】

##### 【発明の効果】

本発明の阻害剤は、上記のように癌患者に対する有効な治療法として期待できることに加え、前立腺癌や乳癌でのホルモン感受性癌から抵抗性癌への移行を防ぐための予防又は／及び治療薬としても期待できる。更に、固形癌及び肉腫の成長に伴う血管新生、癌転移に伴う血管新生、糖尿病性網膜症に伴う血管新生、動脈硬化、乾癬等の予防又は／及び治療薬としても期待できる。

#### 【 0 0 3 9 】

##### 【図面の簡単な説明】

【図 1】

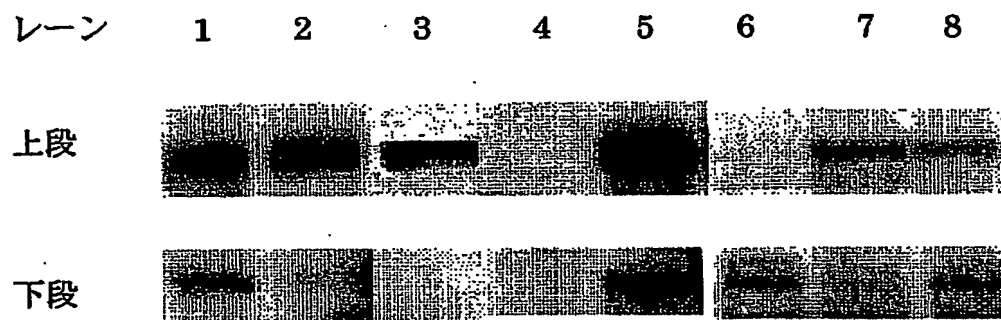
実施例 4 の化学発光をルミノ CCD カメラで撮影した図である。

【書類名】

図面

【図1】

ウェスタンブロット法による EGFR, Her2 発現確認





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 患者に対して薬剤の処方を行う際、薬剤の標的分子の発現を診断した後  
に薬剤を投与する、効果的な予防又は／及び治療薬を提供する。

【解決手段】

Her2又は／及びEGFRが過剰発現していると予想される患者において、Her2又は／  
及びEGFRの発現診断を行い、Her2又は／及びEGFRの過剰発現が確認された患者に  
対して投与することを特徴とするHer2又は／及びEGFR阻害剤並びに、かかる阻害  
剤を含有する医薬組成物。

【選択図】 なし

特2002-162130

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-162130
受付番号	50200803490
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成14年 6月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 6月 3日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006725]

1. 変更年月日	2001年10月 1日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号
氏 名	三菱ウェルファーマ株式会社